

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001 年 7 月 19 日 (19.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/51480 A1(51) 国際特許分類: C07D 309/32, 493/08, A61K
31/351, 31/357, A61P 43/00, 1/16, 29/00滋賀県草津市西渋川二丁目6-32 Shiga (JP). 加藤郁之
進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府宇治
市南陵町1-1-150 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00082

(74) 代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大
手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 1 月 11 日 (11.01.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-4989 2000 年 1 月 13 日 (13.01.2000) JP
特願2000-303711 2000 年 10 月 3 日 (03.10.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto
(JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 榎 竜嗣 (ENOKI,
Tatsuji) [JP/JP]; 〒520-0865 滋賀県大津市南郷一丁
目 10-23-202 Shiga (JP). 山下周作 (YAMASHITA,
Syusaku) [JP/JP]; 〒520-2133 滋賀県大津市野郷原
1-14-3-202 Shiga (JP). 西村香織 (NISHIMURA, Kaori)
[JP/JP]; 〒520-0853 滋賀県大津市蛸谷1-13-205 Shiga
(JP). 佐川裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025添付公開書類:
— 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGENTS CORRECTING GENE EXPRESSION REGULATORY ERROR

(54) 発明の名称: 遺伝子発現調節不調補正剤

(57) Abstract: Agents correcting gene expression regulatory error characterized by containing specific compounds as the active
ingredient; remedies or preventives for diseases wherein specific gene expression error is to be corrected; and a method of correcting
gene expression regulatory error characterized by administering the above-described compounds to mammals.

(57) 要約:

本発明は、特定の化合物を有効成分として含有することを特徴とする、遺伝子
発現調節不調補正剤、特定の遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患の治療剤
または予防剤、ならびに前記化合物を哺乳動物に投与することを特徴とする遺伝
子発現調節不調の補正方法を提供する。

WO 01/51480 A1

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

遺伝子発現調節不調補正剤

技術分野

本発明は天然物由来の生理活性物質の利用に関し、該生理活性物質を有効成分とする医薬に関する。

従来技術

インターロイキンは免疫反応に関連する細胞間相互作用を媒介するポリペプチド性物質であり、インターロイキン1～18が知られており、それぞれ生体の恒常性の維持に寄与している。かかるインターロイキンは、免疫、炎症反応の制御作用、抗腫瘍作用等を媒介するサイトカインの一群の分子種をなす。

インターロイキン中のインターロイキン-6 (IL-6) は、B細胞の最終分化を誘導する分化因子としてそのcDNAがクローニングされた。その後、IL-6 は、免疫応答だけでなく、造血系、神経系の細胞分化や急性反応に関与していることが明らかになった。さらに、IL-6 は種々の免疫異常や炎症性疾患、リンパ系腫瘍の発症とも密接に関係していることが明らかになった。

IL-6 は、B細胞に対し抗体産生を誘導し、IL-6 により、IgM、IgG、IgA の各クラスの免疫グロブリンが産生されるが、インターロイキン-4 とは異なり、クラススイッチには関与しない。IL-6 はB細胞やプラズマサイトの増殖因子としても働いている。またIL-6 は、T細胞系にも関与しており、T細胞を増殖させたり、分化させたりする。更にIL-6 は、造血系にも関与しており、インターロイキン-3 と協調して、G0 期を短縮させることにより造血幹細胞を増殖させる。また巨核球の成熟を促し血小板の増加を誘導する。

さらに、IL-6 は細菌やウイルス感染、悪性腫瘍など生体が即座に反応する

急性反応にも関与している。IL-6は神経系にも関与しており、グリオブラストーマやアストロサイトーマなどの神経系細胞から分泌され、神経系の分化誘導にも働く〔用語ライブラリー『サイトカイン・増殖因子』、「実験医学」別冊、p 28-29、(1995年)、羊土社〕。

また、インターロイキン-10 (IL-10)は広い範囲のサイトカインの合成を阻害するタイプのサイトカインとして知られ、II型ヘルパー細胞より産生され、Th1細胞により産生されるサイトカインを抗原提示細胞の抑制により間接的に抑制する。それゆえ、IL-10の産生が過度になると、インターフェロン γ 等の産生が抑制されるため免疫力の低下につながる。

その他、白血球走化性を有する因子群であるケモカインは、アレルギー性炎症や自己免疫疾患との深いつながりが指摘されている。ケモカインは、そのアミノ酸配列中のシステインの位置によりCXCケモカインとCCケモカインの2つのファミリーに大別される。前者としては、たとえば、マクロファージインフラマトリープロテイン-2- β (MIP2 β)、マクロファージインフラマトリープロテイン-2- α (MIP2 α)、グロースレギュレイテッドプロテイン-1 (Gro1)等が、後者としては、たとえば、マクロファージインフラマトリープロテイン-1- α (MIP1 α)、ランテス〔RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)〕、マクロファージインフラマトリープロテイン-1- β (MIP1 β)、リバーアンドアクチベーションレギュレイテッドケモカイン (LARC)、マクロファージデライブドケモカイン (MDC)等が挙げられる。

また、腫瘍壊死因子 α (TNF α)は、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患や炎症性疾患において炎症を直接惹起していることが知られている。

このように、サイトカインは本来、生体の恒常性の維持にとって重要であるが、その産生が過度である場合、免疫、炎症反応が関与する種々の疾患を引き起こす原因となり得る。

また、かかるサイトカインの作用と共に、生体内組織の炎症および疼痛の惹起にはアラキドン酸代謝が大きく関与することが知られていることから、かかる代謝に関与する、たとえば、プロスタグランジンG/H合成酵素-2 (COX2) 等の作用の調節も前記疾患との関連において重要であると考えられる。

一方、活性酸素も炎症性疾患等に大きく係わる。活性酸素は、大きくラジカルと非ラジカルの活性酸素に分類することができる。ラジカル系活性酸素には、ヒドロキシラジカル、ヒドロキシペルオキシラジカル、ペルオキシラジカル、アルコキシラジカル、二酸化窒素、一酸化窒素、チールラジカル、スーパーオキシドがある。一方、非ラジカル系活性酸素には、一重項酸素、過酸化水素、脂質ヒドロペルオキシド、次亜塩素酸、オゾン、ペルオキシ亜硝酸がある。いずれも多く、の病態、すなわち、各種の炎症性疾患、糖尿病、癌、動脈硬化、神経疾患、虚血再灌流障害などに関わりがある。

生体内では絶えずいくつかの経路で低濃度の活性酸素が生成している。これは生理的にミトコンドリアなどの電子伝達系から漏出するスーパーオキシドや過酸化水素、銅や鉄などの遷移金属が触媒することによるヒドロキシラジカル、好中球や単球などによって生成される感染防御のための次亜塩素酸、アルギニンの分解により生成するNOなど、いずれも避けることのできないものである。これらの活性酸素生成に対して、生体は活性酸素消去系としての酵素、低分子化合物をもち、生成と消去のバランスを保っている。しかし、生成系がなんらかの原因で活性化されたり、逆に消去系が不活性化されて、活性酸素生成系が消去系に対して優位に立った場合、生体は酸化障害を受けることになる。このような状態を酸化ストレスという。さらに、生体内のバランスが崩れた場合だけでなく、大気や食品などの生体外のものからも、生体は常に酸化ストレスにさらされており、日常生活を送る上で酸化ストレスは避けることができない。

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ビリルビンの産生に関与する酵素である生体内酵素である。HOには、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO1) とヘムオキシゲナ

ーゼー 2 (HO_2) の 2 つのアイソザイムが存在することが知られている。また、前記ビリルビンには、脂肪酸の抗酸化作用、脂質ラジカルのスカベンジ作用、好中球の鈍食などに伴い大量に発生する酸素ラジカルによるリン脂質、中性脂肪、コレステロールのヒドロペルオキシドの産生抑制作用、動脈硬化発症と深く関与する LDL (Low density lipoprotein) の産生抑制作用、一重項酸素のスカベンジ作用等の抗酸化物質としての活性があり、内因性抗酸化物質として生体内で重要な役割を担っている。各種ラジカルは、脂質だけでなく、タンパク質、核酸など様々な生体物質に作用して、慢性疾患、癌を引き起こす要因となっているが、ビリルビンは、このような各種ラジカルを減少させる〔『ポルフィリン・ヘムの生命科学－遺伝病・癌工学応用などへの展開－』、「現代医学」増刊 27、(1995 年)、東京化学同人〕。すなわち、HO の活性低下、HO 遺伝子の発現の低下は、生体の酸化ストレスに対する適応を妨げる。それゆえ、HO の産生誘導は生体内における抗酸化作用、抗炎症作用に寄与し得ると考えられる。

また、サイトカインの 1 種である前記ランテスは、好酸球の活性酸素産生を増強することが報告されており、ランテス産生の抑制により、HO の産生誘導と同様な効果が期待できる。

ストレスが負荷された状態や疾病へと移行する状態においては、生体内の恒常性維持機能の変調が認められる。生体内の恒常性維持には種々の機能、前記するような各種生体内因子が複合的に関与するが、そこには基本的には遺伝子の発現状態の悪性の変化(発現調節不調)が存在する。しかしながら、たとえば、ストレスを受けている状態や、それが回避される過程での、遺伝子レベルでの調節による遺伝子発現の調節の詳細は明らかではなく、それゆえ、かかる遺伝子レベルの調節による遺伝子の発現調節不調の回避手段はいまだ見出されていない。

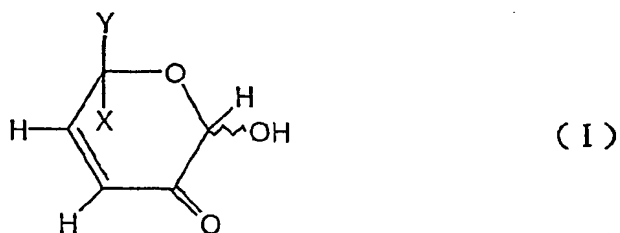
発明の開示

生体の恒常性の維持にはインターロイキン類や活性酸素の除去に作用する生体

内酵素等が関与しており、個々のインターロイキンや生体内酵素の産生の異常により多くの疾病が惹起される。

本発明の目的はインターロイキンや生体内酵素等の各種生体内因子の産生を調節し、生体の恒常性の維持・回復に有用な医薬組成物を提供することにある。

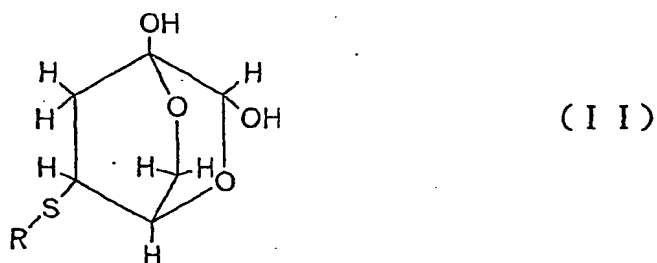
本発明を概説すれば本発明の第1の発明は、下記式(I)：



(式中、XおよびYは、HまたはCH₂OH、ただし、XがCH₂OHのとき、YはH、XがHのとき、YはCH₂OHである。)

で表される化合物、

式(II)：



(式中、RはSH基含有化合物から1つのSH基を除いた残基である。)

で表される化合物、

及びそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子発現調節不調補正剤に関する。本発明の第1の発明において、当該遺伝子発現調節不調補正剤により発現調節不調を補正できる遺伝子としては、例えば、下記のような31種の遺伝子群、すなわち、

インターロイキン-6 [interleukin-6 (ジーンバンクAccession 番号:M14584)] 遺伝子、

インターロイキン-10 [interleukin-10 (ジーンバンクAccession 番号:M57627)] 遺伝子、

ヘムオキシゲナーゼ-1 [hemeoxygenase-1 (ジーンバンクAccession 番号:NM 002133)] 遺伝子、

プロスタグランジンG/H合成酵素-2 [prostaglandin G/H synthase-2 (ジーンバンクAccession 番号:AL033533)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-1- α [macrophage inflammatory protein -1- α (ジーンバンクAccession 番号:M23452)] 遺伝子、

ランテス [RANTES (ジーンバンクAccession 番号:NM 002985)] 遺伝子、

インターロイキン-1 α [interleukin-1 α (ジーンバンクAccession 番号:X02851)] 遺伝子、

インターロイキン-1 β [interleukin-1 β (ジーンバンクAccession 番号:K02770)] 遺伝子、

腫瘍壊死因子 α [tumor necrosis factor α (ジーンバンクAccession 番号:M10988)] 遺伝子、

インターロイキン-7 レセプター [interleukin-7 receptor (ジーンバンクAccession 番号:M29696)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-1- β [macrophage inflammatory protein-1- β (ジーンバンクAccession 番号:J04130)] 遺伝子、

リバー アンド アクチベーション-レギュレイテッド ケモカイン [liver and activation-regulated chemokine (ジーンバンクAccession 番号:D86955)] 遺伝子、

マクロファージ-デライブド ケモカイン [macrophage-derived chemokine (ジーンバンクAccession 番号:U83171)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-2- β [macrophage inflammatory protein-2- β (ジーンバンクAccession 番号: M36821)] 遺伝子、
マクロファージ インフラマトリー プロテイン-2- α [macrophage inflammatory protein-2- α (ジーンバンクAccession 番号: M36820)] 遺伝子、
グロース レギュレイテッド プロテイン-1 [growth regulated protein-1 (ジーンバンクAccession 番号: J03561)] 遺伝子、
マトリックス メタロプロテイナーゼ-9 [matrix metalloproteinase-9 (ジーンバンクAccession 番号: J05070)] 遺伝子、
ミグレイション インヒビトリー ファクター-リレイテッド プロテイン-8 [migration inhibitory factor-related protein-8 (ジーンバンクAccession 番号: X06234)] 遺伝子、
リゾザイム [lysozyme (ジーンバンクAccession 番号: M21119)] 遺伝子、
ギャバ(A) レセプター-アソシエイテッド プロテイン [GABA(A) receptor-associated protein (ジーンバンクAccession 番号: NM 007278)] 遺伝子、
インターフェロン-インデュースド 17-kDa/15-kDa プロテイン [interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein (ジーンバンクAccession 番号: M13755)] 遺伝子、
インターフェロン-インデュシブル プロテイン p78 [interferon-inducible protein p78 (ジーンバンクAccession 番号: M33882)] 遺伝子、
エスシーオー ホモログ-2 [SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog-2 (ジーンバンクAccession 番号: AL021683)] 遺伝子、
トランスケトラーゼ [transketolase (ジーンバンクAccession 番号: L12711)] 遺伝子、
アデノシン A2a レセプター [adenosine A2a receptor (ジーンバンクAccession 番号: S46950)] 遺伝子、
CD37 アンチゲン [CD37 antigen (ジーンバンクAccession 番号: X14046)]

〕遺伝子、

プロパージン P ファクター [properdin P factor, complement (ジーンバンクAccession 番号: M83652)] 遺伝子、

レギュレーター オブ G-プロテイン シグナリング-2 [regulator of G-protein signaling-2 (ジーンバンクAccession 番号: L13463)] 遺伝子、

Nef-アソシエイテッド ファクター-1 [Nef-associated factor-1 (ジーンバンクAccession 番号: AJ011896)] 遺伝子、

ミエロイド ロイケミア セル ディファレンシエイション プロテイン-1 [myeloid leukemia cell differentiation protein-1 (ジーンバンクAccession 番号: L 08246)] 遺伝子、及び

シグナル ペプチダーゼ コンプレックス [signal peptidase complex (18kDa) (ジーンバンクAccession 番号: AF061737)] 遺伝子、

からなる群から選択される1以上の遺伝子が例示される。

本発明の第2の発明は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、およびそれらの塩から選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする、前記31種の遺伝子群から選択される1以上の遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患の治療剤または予防剤に関する。かかる治療剤または予防剤は、前記遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患が炎症性疾患である場合に対し特に好適である。また、治療剤または予防剤の一態様としては、たとえば、インターロイキン-6産生抑制剤、インターロイキン-10産生抑制剤、ヘムオキシゲナーゼ産生誘導剤、プロスタグランジンG/H合成酵素-2産生抑制剤、マクロファージ インフラマトリー プロテイン-1- α 産生抑制剤、ランテス産生抑制剤、腫瘍壊死因子 α 産生抑制剤等が挙げられ、特に、ここに具体的に例示する各種生体内因子の産生抑制剤または産生誘導剤として好適に用いられる。

なお、本明細書において、「誘導」の意には、当該薬剤の投与前に比し、生体内における目的物質の量が増加することをいう「増強」の意を含むものとする。

本発明の第3の発明は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、およびそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することを特徴とする遺伝子発現調節不調の補正方法に関する。本発明の第3の発明により遺伝子の発現調節不調を補正することのできる遺伝子としては、例えば、前記の31種の遺伝子群から選択される1以上の遺伝子が例示される。

図面の簡単な説明

第1図は、各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のIL-6の濃度を示す図である。

第2図は、各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のIL-10の濃度を示す図である。

第3図は、COX2 mRNA由来cDNAのPCRによる増幅の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

第4図は、MIP1 α mRNA由来cDNAのPCRによる増幅の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

第5図は、ランテス mRNA由来cDNAのPCRによる増幅の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

第6図は、DGE 添加あり又はなしの各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のTNF α の濃度を示す図である。

第7図は、アガロビオース添加あり又はなしの各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のTNF α の濃度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明においては、有効成分として、前記式(I)で表わされる化合物、前記式(II)で表わされる化合物、及びそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物が用いられる。また、後述するようにプロドラッグとして機能し得る当

該化合物の誘導体であってもよい。従って、本発明に係る有効成分には、本発明の所望の効果が得られ得る限り前記式 (I) および (I I) の誘導体ならびにその塩も包含される。

本発明に使用する式 (I) で表される化合物は、還元末端に 3, 6-アンヒドロガラクトースを有する化合物、例えば、アガロビオース、 κ -カラビオース等の中性からアルカリ性の条件下に維持することにより得ることができる。また、構造中に 3, 6-アンヒドロガラクトースを含有する化合物を pH 7 未満で酸加水分解および／または酵素分解に供し、ついで得られた酸分解物および／または酵素分解物を中性からアルカリ性の条件下に維持することにより得ることができる。構造中に 3, 6-アンヒドロガラクトースを含有する化合物としては、たとえば、アガロビオース、アガロテトラオース、アガロヘキサオース、アガロオクタオース、 κ -カラビオース等を挙げることができる。

還元末端に 3, 6-アンヒドロガラクトースを含有する化合物、例えば、アガロビオース、 κ -カラビオース等の pH 7 以上の中性からアルカリ性の条件下での維持において、これらの化合物から選択される少なくとも 1 以上の化合物を溶解または懸濁して反応を行うための反応液の組成は特に限定されるものではないが、好ましくは水（たとえば、蒸留水、イオン交換水、水道水等）を溶媒とし、アルカリの種類に特に限定はないが、たとえば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、アンモニア等の無機塩基、トリス、エチルアミン、トリエチルアミン等の有機塩基を溶解させたものが使用可能である。アルカリの濃度も特に限定はないが、好ましくは 0.0001～5 規定、より好ましくは 0.001～1 規定の濃度で使用可能である。また、反応温度も特に限定はないが、好ましくは 0～200℃、より好ましくは 20～130℃に設定すればよい。また反応時間も特に限定はないが、好ましくは数秒～数日に設定すればよい。アルカリの種類と濃度、反応温度および反応時間ならびに反応液に溶解または懸濁する原料となる上記化合物の量は、当該化合物の種類および目的とする式 (I) で

表される化合物の生成量により適宜選択すればよい。一般に、pH 7 以上であれば良いが、低濃度のアルカリよりも高濃度のアルカリ、低温よりも高温を選択することにより式 (I) で表される化合物の生成は速やかに進行する。

例えば、アガロビオースまたは κ -カラビオースの pH 11.5 の溶液を調製し、37℃で5分間維持することにより、式 (I) で表される化合物が生成する。

生成した式 (I) で表される化合物を含有するアルカリ液は、目的に応じ中和して用いても良く、また pH 7 未満に調整し酸性溶液として使用しても良い。

また、構造中に3, 6-アンヒドロガラクトースを含有する化合物を pH 7 未満で酸加水分解および/または酵素分解に供し、ついで中性からアルカリ性の条件下に前記同様に維持することにより、式 (I) で表される化合物を得る場合、酸加水分解としては、たとえば、酸として塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸等を好ましくは0.001～5規定用い、水を溶媒として反応液を調製し、該反応液に原料となる化合物を適量溶解または懸濁して、反応温度を好ましくは0～200℃、反応時間を好ましくは数秒～数日として反応を行えばよい。また、酵素分解を行う場合、酸加水分解において用いられるのと同様の反応液および反応条件にて、たとえば、酵素として α -アガラーゼ、例えば国際公開第00/50578号パンフレットに記載の α -アガラーゼを適量用い、当該酵素が活性を示す条件下で反応を行えばよい。

反応液中に含まれる本発明の式 (I) で表される化合物の精製手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いればよく、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー等の精製方法を組合せて精製すればよい。

例えば、アガロビオースの中性からアルカリ性の条件下での処理物より式 (I) で表される化合物のXがCH₂OH、YがHである化合物が精製され、 κ -カ

ラビオースの中性からアルカリ性での条件下での処理物より、式(I)で表される化合物のXがH、YがCH₂OHである化合物が精製され得る。

本発明において使用する式(II)で表される化合物は、式(I)で表される化合物とSH基含有化合物とを反応させることにより、反応液中に生成させることができる。

使用するSH基含有化合物は少なくとも1つのSH基を有する化合物であれば何ら限定はない。式(II)中のRは、SH基含有化合物と式(I)で表される化合物との反応により、式(I)と当該SH基含有化合物との結合に消費される1つのSH基を除く、残りの残基をいう。従って、SH基含有化合物がSH基を2以上有する場合には、Rで表わされる残基中には1以上のSH基が存在することになる。かかるSH基含有化合物の例としては、メタンチオール、ブタンチオール、メルカプトエタノール、SH基含有アミノ酸、SH基含有アミノ酸誘導体等が挙げられる。

SH基含有アミノ酸の例としては、システイン、ホモシステイン等が挙げられる。また、SH基含有アミノ酸誘導体としては、上記アミノ酸の誘導体、例えばシステイン誘導体、システイン含有ペプチド、システイン誘導体含有ペプチドが例示される。システイン誘導体としては、例えばシステインのアミド化合物、アセチル化合物、エステル化合物等が挙げられる。システイン含有ペプチドとしてはペプチド中にシステインが構成成分となっていれば良く、特に限定はない。当該システイン含有ペプチドとしては、オリゴペプチド、例えばグルタチオンのような低分子物からタンパク質のようなポリペプチドからなる高分子物までを包含する。またシスチン又はホモシスチンを含有するペプチドも反応中にシステイン又はホモシステイン含有ペプチドとなる条件下、例えば還元処理を組合せることにより、本発明においてシステイン又はホモシステイン含有ペプチドとして使用することができる。システイン誘導体含有ペプチドとしては、前記システイン含有ペプチドにおいて、システインがシステイン誘導体からなる物質を挙げること

ができる。

なおシステイン含有ペプチドとしては、糖質、脂質等を含有するシステイン含有ペプチドも包含される。また、上記した各種の物の塩、酸無水物、エステル等であってもよい。

式(I I)で表される化合物を製造する際の式(I)で表される化合物とSH基含有化合物との反応は、公知の反応条件で行えばよく、SH基含有化合物のSH基が反応性を有する条件であれば、特に限定はない。たとえば、水、PBS等の溶液中で、式(I)で表される化合物とシステインやグルタチオン等のSH基含有化合物を、好ましくは0～100℃、より好ましくは30～50℃で、好ましくは1時間～1週間、より好ましくは1晩放置して反応を行えばよい。

式(I)で表される化合物と前記SH基含有化合物とを反応させ、生成した式(I I)で表される化合物の精製、単離手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いて行うことができる。たとえば、前記式(I)で表される化合物の精製手段として例示したような各種手段を組み合わせる用いることができる。

また、式(I)で表わされる化合物は、生体内で、例えばSH基含有化合物(例えばシステイン、グルタチオン等)と反応し、本発明において使用される式(I I)で表わされる化合物に代謝的にも変換され得る。

前記式(I)または式(I I)で表される化合物の塩としては、好ましくは医薬として許容される塩であり、公知の方法にて変換することができる。たとえば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸等の無機塩、ギ酸、酢酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸等の有機酸との塩や、ヨウ化メチル等のアルキルハライド、ベンジルハライド等と反応させて得られるアンモニウム塩等が挙げられる。

また、前記式(I)または(I I)で表わされる化合物の光学異性体、ケト-エノール互変異性体、幾何異性体等の各種異性体は全て本発明において使用することができ、また、各異性体の単離されたものであっても、その混合物であって

もよい。

さらに、本発明において使用される前記式 (I) または (I I) で表わされる化合物は、たとえば、エステルとすることができる等、体内で容易に加水分解し、所望の効果を発揮し得る誘導体 (プロドラッグ) を形成可能である。かかるプロドラッグの調製は公知の方法に従えばよい。

なお、前記異性体および誘導体は、それらの塩であってもよい。

本発明において有効成分として使用される式 (I) で表される化合物、式 (I I) で表される化合物、及びそれらの塩は、癌細胞 (HL-60 細胞) 増殖抑制活性を指標として探索した結果、見出されたものである。従って、当該有効成分は本来的にアポトーシス誘発活性、制癌活性という作用を有するものと考えられる。当該有効成分は、具体的に、種々の生体内因子の産生調節作用、当該因子をコードする遺伝子の発現調節作用を有しており、例えば、IL-6 産生抑制作用、IL-10 産生抑制作用、HO 産生誘導作用、COX 2 産生抑制作用、MIP 1 α 産生抑制作用、ランテス産生抑制作用、TNF α 産生抑制作用等の生理活性を有する。中でも、生理活性として、ここに具体的に例示する各種作用に優れる。このような生理活性の発現は、産生抑制または産生誘導の対象となる各種生体内因子の遺伝子転写活性化抑制または誘導および／または各種細胞からの産生抑制または誘導により奏されるものと推定される。また、その作用は生体の恒常性の維持・回復に働くものであり、特に副作用の心配もない。かかる生理活性は後述の実施例により明らかである。なお、各種生体内因子の産生抑制作用は、細胞毒性による作用ではないことを確認している。

本発明によれば、前記有効成分の、これらの活性に基づく、本明細書において例示するような各種生体内因子の遺伝子の発現調節不調を補正する、遺伝子発現調節不調補正剤が提供され、また、前記有効成分を含んでなる、各種生体内因子の遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患の治療剤または予防剤が提供される。かかる治療剤または予防剤としては、たとえば、IL-6 産生抑制を要する疾

患、IL-10産生抑制を要する疾患、HO産生誘導を要する疾患、COX2産生抑制を要する疾患、MIP1 α 産生抑制を要する疾患、ランテス産生抑制を要する疾患、TNF α 産生抑制を要する疾患等の治療剤または予防剤が挙げられる。また、かかる治療剤または予防剤は、IL-6産生抑制剤、IL-10産生抑制剤、HO産生誘導剤、COX2産生抑制剤、MIP1 α 産生抑制剤、ランテス産生抑制剤、TNF α 産生抑制剤等として使用することができ、ここに具体的に例示するものとしての利用が好適である。それゆえ、本発明は、前記有効成分のIL-6産生抑制剤、IL-10産生抑制剤、HO産生誘導剤、COX2産生抑制剤、MIP1 α 産生抑制剤、ランテス産生抑制剤又はTNF α 産生抑制剤の製造における使用も包含する。なお、本明細書において、「遺伝子の発現調節不調を補正する」とは、特に限定するものではないが、疾病や種々の外的要因によってその発現状態が正常なレベルから逸脱した遺伝子について、当該遺伝子の発現を生体の恒常性が回復する方向へ向けることをいう。例えば、疾病によって発現量が上昇することにより、病状を悪化させている遺伝子の発現量を抑制すること、疾病からの回復のために発現が誘導された遺伝子について、その発現量を維持、増強すること等が包含される。すなわち、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤(suppressor for unbalance of gene expressions)とは、疾病や種々の外的要因に伴う遺伝子の発現状態の不均衡(unbalance of gene expressions)を抑制するもの(suppressor)である。よって、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は不均衡な遺伝子発現状態の改善または予防に使用することができる。言い換えれば、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は生体の恒常性維持に遺伝子発現のレベルで寄与するものであり、遺伝子発現異常の調節剤(modulator of gene expressions disorder)ともいうことができる。

自己免疫疾患様症状を示す辛抱粘液腫の患者では、腫瘍細胞から大量のIL-6が産生されている。また、多発性骨髄腫患者由来のミエローマ細胞の増殖が抗IL-6抗体で抑制されることより、IL-6は、ミエローマ細胞の自己増殖因

子である可能性が高い。さらに、原発性糸球体腎炎患者の尿中にも IL-6 が含まれており、IL-6 が腎メサンギウム細胞の増殖因子として働いている。ここに例示する疾患はいずれも IL-6 の異常産生が一因であると考えられ、従って、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤はかかる疾患に対し有用であり、また、IL-6 遺伝子の発現調節の不調の補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、IL-6 の産生を抑制することでかかる疾患を予防又は治療することができる。

IL-10 の産生が過度の場合、インターフェロン γ 等の産生が抑制され、その結果、免疫が抑制されるに至る。それゆえ、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、IL-10 の産生過剰を一因として免疫が抑制された疾患、例えばインターフェロン γ 遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患（たとえば、喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患）に対し有用であり、また、IL-10 遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、IL-10 の産生を抑制することでかかる疾患を予防又は治療することができる。

HO には、33kDa の HO 1 と 36kDa の HO 2 の 2 つのアイソザイムが存在する。HO 2 は HO 1 の N 末端側に 20 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列が余分についた構造を持つ。残りの部分の相同性は 40～50% であるが、高次構造は良く似ている。両者ともに C 末端部に疎水性領域があり、この部分でミクロソーム膜に結合している。ミクロソームをトリブシン処理するとヘム分解活性を有する可溶性画分が得られることから、活性中心を含む大きなドメインは細胞質側に突き出ていると思われる。

HO 1 は誘導酵素であり、基質であるヘム、重金属イオン、ある種の有機化合物、過酸化水素、あるいは、熱ショック、UV 照射、虚血というような化学的、物理的要因によって種々の細胞で顕著に誘導される。HO 2 は構成酵素で、各組織で発現しているが、特に脳や精巣で活性が高い。

H₂O₂はヘムをビリベルジン、CO、鉄に分解し、ビリベルジンは、さらに還元酵素により、ビリルビンとなる。このビリルビンは各種ラジカルを減少させる。つまり、H₂O₂を誘導することにより、抗酸化活性を有するビリルビンの産生が誘導され、ラジカルの発生により惹起される各種疾患（たとえば、各種の炎症性疾患、糖尿病、癌、動脈硬化、神経疾患、虚血再灌流障害等）を治療または予防することができる。すなわち、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、かかる疾患に対し有用であり、また、H₂O₂遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、H₂O₂の産生を誘導することでかかる疾患を予防または治療することができる。

生体内組織の炎症および疼痛の惹起にはアラキドン酸代謝が大きく関与している。アラキドン酸代謝にはCOX 2が関与しており、COX 2の作用により細胞膜リン脂質由来のアラキドン酸は、プロスタグランジン、プロスタサイクリン、トロンボキサンの三者に代謝される。すなわち、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤により、COX 2の産生を抑制することで、鎮痛、抗炎症作用を発現させることができる。また、COX 2遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、COX 2の産生を抑制することで生体内組織の炎症および疼痛の惹起を予防又は治療することができる。

ケモカインとは、特定の白血球走化性を有するサイトカインであり、アレルギー性炎症、自己免疫疾患と深いつながりがある。ケモカインは、前記するようにCXCケモカインとCCケモカインの2つのサブファミリーに分けられる。ケモカインは、92～99個のアミノ酸から成り、それぞれがジスルフィド結合する4つのシステイン残基を保有する。CXCケモカインは、はじめの2つのシステイン残基の間に他のアミノ酸が1つ介在しており、CCケモカインは、かかるアミノ酸の介在が無い。CXCケモカインは、主に好中球に走化作用を示し、CCケモカインは、リンパ球、単球、好塩基球、好酸球に走化作用を示す。

ランテスは、CCケモカインに属し、特に好酸球に強い走化性を示す。また、

ランテスは、T細胞、B細胞、単球、繊維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、血小板、気道上皮細胞、さらには、好酸球自身からも生産される。ランテスは、好酸球に対する強い走化作用だけでなく、脱顆粒についても関係している。ランテスは、ヘルパー（CD4⁺）T細胞でメモリーT細胞を選択的に遊走させ、アレルギー性炎症の鍵を握るサイトカインである。実際、喘息でランテスが上昇していること、アレルギー性結膜炎で、涙液中にランテスが存在することなどが報告されている。一方、ランテスは、好酸球の活性酸素生産を増強することも報告されている。したがって、ランテスの産生を抑制することにより、ランテスの作用を一因とする喘息、アレルギー性の炎症性疾患（たとえば、アレルギー性結膜炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性胃腸炎、アレルギー性血管炎、アレルギー性脊髄炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、アレルギー性脳脊髄炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性膀胱炎等）の予防または治療が期待できる。また、好酸球による活性酸素の産生が抑制されることから、生体内における抗酸化効果、抗炎症効果の発現が期待できる。従って、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、ランテスの作用を一因とする前記疾患に対し、また、たとえば、HOの産生誘導が有用であるとして例示した前記疾患に対し有用であり、また、ランテス遺伝子の発現調節不調補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、ランテスの産生を抑制することで前記疾患を予防または治療することができる。

MIP1 α もランテスと同様のCCケモカインであり、CCケモカインの特徴を有する。しかし、MIP1 α はランテスより走化作用は低く、例えば気管支喘息患者においても発現のパターンが異なり、ランテスは発作初期から上昇するのに対し、MIP1 α は、治療後の増悪に先立って上昇することが報告されている。したがって、MIP1 α の産生を抑制することにより、喘息や前記例示するようなアレルギー性の炎症性疾患の増悪を阻止することが可能であると考えられる。すなわち、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、特にかかる疾患の増悪の阻止に対し有用であり、また、MIP1 α 遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾

患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、MIP1 α の産生を抑制することでかかる疾患の増悪を予防又は治療することができる。

本発明において用いられる有効成分の1つである、後述の実施例において記載するアガロオリゴ糖、DGEは、ランテスおよびMIP1 α の両者の遺伝子の発現調節不調を補正することができるので、アレルギー性の炎症性疾患の予防、治療、さらには、治療中の病体の増悪の阻止にも効果を有すると考えられる。

サイトカインの他の1種であるTNF α は、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患や炎症性疾患において、かかる疾患に関与する炎症を直接惹起していると考えられている。

TNF α は、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として発見されたが、現在では炎症を基本とした生体防御・免疫機構に広くかかわるサイトカインとして認識されており、TNF α の産生調節機構の破綻は様々な不都合を宿主にもたらす。すなわち、TNF α の過度または未調節の産生は、慢性関節性リウマチ、リウマチ性脊髄炎、変形性関節症、痛風性関節炎、敗血症、敗血性ショック、内毒素ショック、グラム陰性菌敗血症、毒性ショック症候群、脳性マラリア、慢性肺炎、移植片対宿主反応、同種移植片拒絶反応、インフルエンザのような感染症による発熱および筋肉痛、感染または悪性腫瘍の二次的な悪液質、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の二次的な悪液質、AIDS、AIDS関連症候群、ケロイド形成、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、自己免疫糖尿病および全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患を含む、これらの多くの疾患に関連している[モレキュラー・メディシン(Molecular Medicine)、第33巻、第1010～1020頁、第1182～1189頁(1996)]。

従って、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、前記例示するような、TNF α により媒介されるかまたは悪化する疾患に対し有用であり、また、TNF α 遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患に対し、本発明の治療剤又は予防剤を用い、TNF α の産生を抑制することでかかる疾患を予防または治療することがで

きる。たとえば、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤等を用いることにより、炎症、リウマチ、特に慢性関節リウマチの症状が改善され、炎症マーカーであるC反応タンパク質（CRP）値、リウマトイド因子（rheumatoid factor：RF）値、赤血球沈降速度（血沈）値が激減し、歩行困難等の合併症状も顕著に改善される。

さらに、本発明において使用される前記有効成分は、生体の恒常性維持にとって重要なその他各種生体内因子の遺伝子の発現調節不調を補正する作用を有する。

生物は、生活環境の変化等の外的要因、ウィルス、細菌感染等の内的要因により、様々なストレスを受ける。ストレスとしては、例えば高温、低温環境、飢餓状態、化学物質への暴露等が例示される。たとえば、化学物質としては、テトラデカノイルホルボールアセテート（TPA）、リポポリサッカライド（LPS）、フィトヘムアグルチニン（PHA）、オカダ酸等が挙げられる。中でも、TPAやLPSは、生体に投与することで炎症を惹起させ、かかる作用を利用して人工的に炎症モデルを作製する目的で使用されている。

上記のようなストレスを受けた結果、生体内では、様々な遺伝子の発現が変化する。その中には、ストレスの結果、発現が誘導もしくは増強され、生体に悪影響を及ぼす遺伝子群（A群）もあれば、発現が抑制されることにより、正常な生体の生命活動に支障をきたす遺伝子群（B群）もある。ストレスを受け、上記の各遺伝子群の発現調節の不調状態が続くと、様々な疾患の発病につながる。従って、ストレスを受けた際の遺伝子発現の変動を正常時の状態に回復させることは様々な疾患の治療または予防につながる。

すなわち、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤等によれば、前記サイトカイン類および各種酵素類を含め、何らかのストレスにより発現調節不調を生ずるような各種生体内因子の遺伝子の発現調節不調状態を、通常の状態（恒常性が保たれている健康状態）に戻すことができる。

たとえば、本発明の有効成分として使用し得る、後述の実施例において記載の D G E が、遺伝子の発現調節不調を正常な状態に補正し得る遺伝子（A 群、B 群）としては、具体的に表 1 および表 2 に示すものを挙げることができる。

表 1

遺伝子名（略号）	ジーンバンク Accession 番号
・ サイトカインおよびサイトカインレセプター	
interleukin-6 (IL-6)	M14584
Interleukin-1 α (IL-1 α)	X02851
interleukin-1 β (IL-1 β)	K02770
tumor necrosis factor α (TNF α)	M10988
interleukin-7 receptor (IL-7r)	M29696
・ C C ケモカイン	
macrophage inflammatory protein-1- β (MIP1 β)	J04130
liver and activation-regulated chemokine (LARC)	D86955
macrophage-derived chemokine (MDC)	U83171
・ C X C ケモカイン	
macrophage inflammatory protein-2- β (MIP2 β)	M36821
macrophage inflammatory protein-2- α (MIP2 α)	M36820
growth regulated protein-1 (Gro1)	J03561

表 2

遺伝子名 (略号)	ジーンバンクAccession 番号
・ その他	
matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)	J05070
migration inhibitory factor-related protein-8 (MRP8)	X06234
lysozyme (Lyz)	M21119
GABA(A) receptor-associated protein (GABArp)	NM007278
interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein (IFNp15/p17)	M13755
interferon-inducible protein p78 (IFNp78)	M33882
SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast)	AL021683
homolog-2 (SCO2)	
transketolase (TK)	L12711
adenosine A2a receptor (ADORA2A)	S46950
CD37 antigen (CD37)	X14046
properdin P factor, complement (PFC)	M83652
regulator of G-protein signaling-2 (RGS2)	L13463
Nef-associated factor-1 (NAF1)	AJ011896
myeloid leukemia cell differentiation protein-1 (MCL1)	L08246
signal peptidase complex (18kDa) (SPC18)	AF061737

特に本発明によれば、前記有効成分を含有してなる、前記表 1 および表 2 に例示する各種生体内因子の遺伝子から選択される 1 以上の遺伝子の発現調節不調の補正を要する炎症性疾患に対し好適な治療剤または予防剤が提供される。

本発明の遺伝子発現調節不調補正剤は、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。たとえば、当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分等と常法に従い混合することで製造することができる。かかる補正剤における当該有効成分の含有量は、その投与方法等を考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。また、本発明の治療剤または予防剤は、前記有効成分を含んでなるものであり、当該有効成分と公知の医薬用担体とを組合せて製剤化すればよい。一般的には、当該有効成分を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合し、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加え、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とできる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明の治療剤又は予防剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤または外用剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態および剤型に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤の場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また、経口剤の調製に当っては、さらに、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。たとえば、錠剤または丸剤とする場合は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース等の糖衣または胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤の場合は、製薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロ

ップ剤等とすることができ、たとえば、精製水、エタノール等が担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤等を添加してもよい。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

外用剤としては、経皮投与用または経粘膜（口腔内、鼻腔内）投与用の、固体ないし半固体状、半固体または液状の製剤が含まれる。また、座剤等も含まれる。たとえば、乳剤、ローション剤等の乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤等の液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏等の軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤等の経皮投与用または経粘膜投与用の貼付剤等とすることができる。

以上の各種製剤は、それぞれ公知の医薬用担体等を利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる製剤における有効成分の含有量は、前記遺伝子発現調節不調補正剤の場合と同様である。

たとえば、上記遺伝子発現調節不調補正剤等の投与は、それぞれの製剤形態に応じた適当な投与経路で実施することができる。投与方法も特に限定はなく、内用、外用および注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与することができ、外用剤には座剤等も包含される。

また、投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的、および哺乳動物（たとえば、患者）の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではないが、前記有効成分の投与量は、好ましくは成人1日当り $10\mu\text{g}\sim 200\text{mg}/\text{kg}$ である。製剤として投与する場合には、有効成分の投与量が前記好ましい範囲となるように投与すればよい。ただし、当該投与量は、種々の条件によって変動するので

、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行ってもよい。また、経口投与の方法としては、前記遺伝子発現調節不調補正剤等としてそのまま経口投与すればよく、また、任意に飲食品に前記有効成分を添加して日常的に摂取させることによっても本発明の所望の効果を達成することができる。

また、本発明の一態様として、前記有効成分を哺乳動物に投与する遺伝子発現調節不調の補正方法を提供する。特に、前記例示する各種生体内因子の遺伝子、好ましくは前記31種の遺伝子群から選ばれる少なくとも1種の遺伝子発現調節不調を補正するために好適に使用できる。かかる方法は、たとえば、かかる遺伝子の発現調節不調を補正する必要があると予想される、または、その必要のある哺乳動物に対し、前記有効成分を、好ましくは、本発明の遺伝子発現調節不調補正剤等として投与することにより行うことができ、かかる投与により、所望の生体内因子の産生誘導または産生抑制を生ぜしめ、生体内の恒常性の回復をもたらす。有効成分の投与方法、投与量等は、前記遺伝子発現調節不調補正剤等に準じればよい。かかる方法においては、前記補正剤等は各種因子の産生誘導剤または産生抑制剤として好適に使用される。

さらに、本発明の一態様としては、各種生体内因子、たとえば、サイトカイン類や酵素が関与する疾患の治療剤又は予防剤のスクリーニング方法をも提供することができる。かかるスクリーニング方法は、たとえば、前記例示する各種生体内因子をコードする遺伝子、好ましくは前記31種の遺伝子から選択される少なくとも1種の遺伝子の発現量を変動させる処理に対し、被検物質が前記遺伝子の発現量を補正するか否かを調べることにより行うことができる。

なお、本発明において使用される前記有効成分のいずれのものも、100mg/kgでマウスに単回経口投与しても死亡例は認められない。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

製造例 1 L-グリセロール-1, 5-エポキシ-1 α β , 6-ジヒドロキシーシス-ヘキサ-3-エン-2-オン (DGE) およびD-グリセロール-1, 5-エポキシ-1 α β , 6-ジヒドロキシーシス-ヘキサ-3-エン-2-オン (κ -DGE) の調製

市販の寒天 (Agar Noble) 2. 5 gを50 mlの0. 1 N HClに懸濁し、100℃で13分間加熱して溶解した。室温まで冷却してNaOHでpH12に調整し、次いで中和処理を行った。

中和処理物に対し下記の順相HPLCを行い、各ピークを分取し、減圧下乾固した後に水に溶解した。HL-60細胞を用いて、各画分の癌細胞増殖抑制活性を測定し、保持時間4. 05分～4. 16分の画分に癌細胞増殖抑制活性を確認した。

次に、この保持時間4. 05分～4. 16分の画分を大量に分取し、構造解析を行い、この画分がL-グリセロール-1, 5-エポキシ-1 α β , 6-ジヒドロキシーシス-ヘキサ-3-エン-2-オン (L-glycero-1,5-epoxy-1 α β , 6-dihydroxy-cis-hexa-3-en-2-one: DGE) であることを確認した。以下に順相HPLCの条件を示す:

カラム: PALPAK Type S

(4. 6 mm \times 250 mm、宝酒造社製)

移動相A: 90%アセトニトリル水溶液

移動相B: 50%アセトニトリル水溶液

流速: 1 ml/分

溶出: 移動相A (10分間) \rightarrow 移動相Aから移動相Bへの直線濃度勾配

(40分間)→移動相B(10分間)

検出：195nmにおける吸光度

カラム温度：40℃

同様にして κ -カラビオースのアルカリ処理を前記寒天の場合に準じて行い、得られたアルカリ処理物から同様にして、D-グリセロール-1,5-エポキシ-1 $\alpha\beta$,6-ジヒドロキシ-シス-ヘキサ-3-エン-2-オン(κ -DGE)を精製した。

なお、 κ -カラビオースは下記のように調製した。すなわち、 κ -カラゲナン(シグマ社製、C-1263)2.5gを50mlの0.1N HClに懸濁し、100℃で16分間加熱して溶解した。室温まで冷却してNaOHでpH中性付近まで中和した後、コスモナイスフィルターS(ナカライテスク社製)でろ過し、下記の順相HPLCで分離し、保持時間27.8分の κ -カラビオースを集めて減圧下乾固し、 κ -カラビオースを調製した。以下に順相HPLCの条件を示す：

カラム：PALPAK Type S

(4.6mm×250mm、宝酒造社製)

移動相A：90%アセトニトリル水溶液

移動相B：50%アセトニトリル水溶液

流速：1ml/分

溶出：移動相A(10分間)→移動相Aから移動相Bへの直線濃度勾配

(40分間)→移動相B(10分間)

検出：195nmにおける吸光度

カラム温度：40℃

製造例2 5-L-グルタチオン-S-イル-2-ヒドロキシ-3,7-ジオキサビシクロ[2.2.2]オクタン-1-オール(DGE-GSH)の調製

DGEと還元型グルタチオン（GSH：ナカライテスク社製）をそれぞれ20 mMになるようにPBSに溶解し、37℃で一晩反応させた。この反応液100 μ l を順相カラムPAL-PAK TypeS にて分画した。流速1 ml/分、0～10分間は90%アセトニトリル水溶液、10～50分間は90%アセトニトリル水溶液から50%アセトニトリル水溶液への直線濃度勾配、検出195 nmの条件で順相クロマトグラフィーを行い、1.5分ごとに画分を集めた。各画分を濃縮乾固した後、50 μ l の蒸留水に再溶解し、HL-60細胞を用いて、各画分の癌細胞増殖抑制活性を測定した。その結果、画分番号30～40番付近の画分において、細胞増殖が阻害された。そこで、同様にして調製した活性画分50 μ l を、さらに逆相クロマトグラフィー（TSKgel ODS-80Ts(5 μ m)、東ソー社製、4.6 \times 250 mm) で分画した。流速1 ml/分、0～15分間は0.1% TFA含有蒸留水、15～30分間は0.1% TFA含有蒸留水から0.1% TFA含有50%アセトニトリル水溶液への直線濃度勾配、30～45分間は0.1% TFA含有50%アセトニトリル水溶液、検出215 nmの条件でクロマトグラフィーを行い、1.5分ごとに画分を集めた。各画分を濃縮乾固した後、50 μ l の蒸留水に再溶解し、HL-60細胞を用いて、各画分の癌細胞増殖抑制活性を測定した。その結果、保持時間4～9分付近の画分において、癌細胞増殖抑制活性が確認された。

そこで前出の順相クロマトグラフィーを10回繰返し、当該活性画分を分取し、濃縮乾固後、1 ml の蒸留水に再溶解し順相クロマトグラフィーによる精製画分を調製した。次に、この順相クロマトグラフィーによる精製画分を、さらに前出の逆相クロマトグラフィーにかけ、活性画分を分取し、濃縮乾固した。その結果、20 mM DGEと20 mMグルタチオンの反応液1 ml から5 mgの活性化合物が得られた。この化合物の構造決定を行い、当該化合物が5-L-グルタチオン-S-イル-2-ヒドロキシ-3,7-ジオキサビシクロ[2.2.2]オクタン-1-オール (5-L-glutathion-S-yl-2-hydroxy-3,7-dioxabicyclo[2

.2.2]octan-1-ol (以下、単にDGE-GSHと称す)であることを確認した。

実施例 1

ddy マウス (日本SLC ; メス、7 週齢) の腹腔内に10%ウシ胎仔血清含有RPMI 1640培地 (バイオウィタカー社製、12-702F) を4ml 注入し、よくマッサージした後ぬきとり腹腔細胞を得た。10% ウシ胎仔血清含有RPMI1640培地に腹腔細胞を 10^6 個/ml となるように懸濁し、48穴マイクロタイタープレートに500 μ l ずつ加えて5 %炭酸ガス存在下、37°Cで2 時間培養し、その後、培養上清を除去して接着性細胞を得て腹腔マクロファージとして用いた。各ウェルに新たに10%ウシ胎仔血清含有、フェノールレッド不含、2mM L-グルタミン含有ダルベッコ改良イーグル培地 (バイオウィタカー社製、12-917F) を500 μ l ずつ加えた。各ウェルに5 μ l の2 mMおよび1mM のDGE水溶液をそれぞれ添加 (それぞれ終濃度20 μ M、10 μ M) し、5 μ l の10 μ g/ml 12-o- テトラデカノイルホルボール 13- アセテート (TPA ; ギブコ社製、13139-019)水溶液を添加して更に14時間培養した後、培養上清を回収した。培養上清中のインターロイキン-6 (IL-6) の含量はエンザイムイムノサンドイッチアッセイ (ELISA ; Matched antibody Pair SamplePak mouse IL-6、エンドジェン社製) で測定した。なお、陰性対照としてDGEおよびTPA水溶液を加えない区分 (対照) を、陽性対照としてTPA水溶液のみを添加した区分 (対照+TPA) を設定した。また、測定は全て2連で行った。

この結果、DGE添加区分においてDGEの濃度依存的に、TPA誘導IL-6 産生の抑制が認められた。その結果を第1図に示す。すなわち、第1図は各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のIL-6 の濃度を示す図であり、横軸は培養条件を、縦軸はIL-6 濃度 (ng/ml) を示す。

また、 κ -DGE、DGE-GSHについても同様の試験を行ない、IL-6 産生抑制作用を確認した。

実施例 2

10%ウシ胎仔血清（ギブコ社製）含有、ダルベッコ改良イーグル培地（バイオウィタカー社製、12-604F）にRAW264.7細胞（ATCC TIB 71）を 3×10^5 個/ml になるように懸濁し、48穴マイクロタイタープレートの各ウェルに0.5ml ずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。各ウェルに5 μ l の2 mM DGE水溶液を添加（終濃度20 μ M）して、さらに5 時間培養したのち、5 μ l の100 μ g/mlリボポリサッカライド（LPS、シグマ社製、L-2012）水溶液を添加して18時間培養した後、培養上清を回収した。培養上清中のインターロイキン-10（IL-10）の含量はエンザイムイムノサンドイッチアッセイで測定した。なお、陰性対照としてDGEおよびLPS水溶液を加えない区分（対照）を、陽性対照としてLPS水溶液のみを添加した区分（対照+LPS）を設定した。また、測定は全て2連で行った。

この結果、DGE添加区分において、LPS誘導IL-10産生の抑制が認められた。その結果を第2図に示す。すなわち、第2図は各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のIL-10の濃度を示す図であり、横軸は培養条件を、縦軸はIL-10濃度（pg/ml）を示す。

また、 κ -DGE、DGE-GSHについても同様の試験を行ない、IL-10産生抑制作用を確認した。

実施例 3

10%ウシ胎仔血清（ギブコ社製）含有、ダルベッコ改良イーグル培地（バイオウィタカー社製、12-604F）にRAW264.7細胞（ATCC TIB 71）を 3×10^5 個/ml になるように懸濁し、6穴マイクロタイタープレートの各ウェルに5 mlずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。各ウェルに50 μ l の4mM、2mM あるいは1mM のDGE水溶液を添加（それぞれ終濃度40 μ M、20 μ M、

10 μ M) して15時間培養した。HO1誘導の陽性対照として5 μ l の3mM 15-デオキシ- Δ 12,14 プロスタグランジンJ₂ (ケイマンケミカル社製、18570) ジメチルスルホキシド溶液添加の区分を、また陰性対照として水添加の区分を設定した(なお、ジメチルスルホキシドにHO1の産生誘導作用は認められない)。細胞をスクレイパーによりプレートより剥がして回収し、0.05mMペプスタチンA (シグマ社製、P5318)、0.2mM ロイペプチン (シグマ社製、L2884)、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (ナカライテスク社製、273-27)、10mMエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム、0.1 %Triton X-100 含有0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) に懸濁して1回凍結融解した後、遠心分離して得られた上清をタンパク質画分とした。タンパク質画分中のタンパク質含量はMicro BCA Protein Assay Reagent (宝酒造社販売ピアス社製、P7411) により測定した。得られた各タンパク質画分サンプルと等量の4 %ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、2 %2-メルカプトエタノール、0.001 %ブロムフェノールブルー、20 %グリセロール含有0.125M トリス-塩酸緩衝液 (pH6.8) を混合し100 °Cで5分間処理した後、タンパク質として10 μ g 相当量を12.5%SDS-ポリアクリルアミドゲルに負荷し、20mAの定電流で電気泳動した。泳動後のゲルは、48mMトリス、39mMグリシン、20 %メタノール、0.0375 %SDS 含有ブロッティング緩衝液中、トランスブロットSDセルセミドライブロッティング装置 (バイオラッド社製) を用いて付属のプロトコールによりPVDF膜 (ミリポア社製、IPVH000 10) に15Vの定電圧で25分間転写した。転写後のPVDF膜はブロックエース (大日本製薬社製、UK-B 25) 溶液中で一晩4 °Cでブロックした。ブロック後の膜は0.1 %Tween20 含有リン酸緩衝食塩水により15分間3回緩やかな振とう下で洗浄した。次に200ng/ml 抗HO1抗体 (N-19; サンタクルーズ社製、sc-7696) を含む10 %ブロックエース、0.1 %Tween20 含有リン酸緩衝食塩水中で1時間室温で緩やかな振とう下で反応させ、0.1 %Tween20 含有リン酸緩衝食塩水により15分間3回緩やかな振とう下で洗浄した。次に0.1 %パーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG(H+L)抗体 (ザイ

メッド社製、61-1620) を含む10%ブロッケー、0.1%Tween20 含有リン酸緩衝食塩水中で1 時間室温で緩やかな振とう下で反応し、0.1 %Tween20 含有リン酸緩衝食塩水により15分間 5 回緩やかな振とう下で洗浄した。続いて、PVDF膜をウェスタンブロットケミルミネッセンスリジェントプラス (第一化学社販売NE N ライフサイエンスプロダクツ社製、NEL103) を用いて付属のプロトコールにより染色し、X 線フィルム (コダック社製、CAT165 1454) に感光した。感光後のフィルムはFPM800 (富士フィルム社製) により現像した。

その結果DGEの添加区分においてHO1 タンパク質由来のバンドが確認できた。また、バンドの強さはDGEの濃度依存的であった。この結果を表3に示す。表中においてHO1 タンパク質のバンドの強度に応じて、+の記号を記した。すなわち、表3において全くバンドが見られないものは-と表し、+-、+、++の順にバンドの強度が強くなるものとした。

表3

試料	HO1 タンパク質の バンドの強度
水 (陰性対照)	-
終濃度 40 μ M DGE	++
終濃度 20 μ M DGE	+
終濃度 10 μ M DGE	+-
15- デオキシ- Δ 12,14 プロスタグランジンJ ₂ (陽性対照)	++

また、 κ -DGE、DGE-GSHについても同様の試験を行ない、HO産生

誘導作用を確認した。

実施例 4

(1) PBMCの分離および保存

ヒト健常人ドナーより 400 ml 採血を実施した。採血液を PBS(-) で 2 倍希釈し、Ficoll-paque (ファルマシア社製) 上に重層後 500 × g で 20 分間遠心分離した。中間層の末梢血単核球 (PBMC) をピペットで回収し、RPMI1640 培地 (パイオウイタカー社製) を用いて洗浄した。採取した PBMC は 90% FCS (JRH バイオサイエンシズ社製) / 10% ジメチルスルホキシドからなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。実験時にはこれら保存 PBMC を 37°C 水浴中にて急速融解し、10 μg/ml Dnase (カルビオケム社製) を含む RPMI1640 培地で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出し各実験に供した。

(2) 単球の分離

5 % ヒト AB 型血清、0.1 mM 非必須アミノ酸、1 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM L- グルタミン (以上パイオウイタカー社製)、10 mM HEPES (ナカライテスク社製)、1 % ストレプトマイシン-ペニシリン (ギブコ BRL 社製) を含む RPMI1640 培地 (以下、5HRPMI 培地と略す) に 4×10^6 cells/ml となるように PBMC を懸濁後、6 穴細胞培養プレート (ファルコン社製) に 3 ml/ウェル ずつまき、37°C、5 % CO₂ で湿式インキュベーター内にて 1.5 時間インキュベートした。1.5 時間後に非接着性の細胞を吸引除去し、各ウェルを RPMI1640 培地を用いて洗浄し、2 ml の 5HRPMI 培地を加えて単球を得た。

(3) RNA の調製

上記で得られた単球に対して、各ウェルに 8 μl の 10 mM DGE 水溶液あるいは対照として 8 μl の水を添加し、37°C、5 % CO₂ で湿式インキュベーター内

にて5 時間インキュベートした。この後、各ウェルに2 μ l の1 μ g/ml LPS 水溶液または2 μ l の25 μ M TPAジメチルスルホキシド溶液を添加して、あるいは、いずれのものも添加せずさらに4 時間培養後、RNeasy Mini Kit (キアゲン社製、74104) を用いてキットの説明書に従い各細胞からRNA を調製した。細胞に対し、水のみまたはDGE水溶液のみを添加した区分を陰性対照とし、また、細胞に対し、水とLPS水溶液またはTPA溶液を添加した区分を陽性対照とした。

(4) cDNAの合成

上記により調製したRNA 0.5 μ g と10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、5mM MgCl₂、1mM dNTP 混合液、150pmol のRandom 6mers、60U のRibonuclease Inhibitor (宝酒造社製、2310A)、15U のReverse Transcriptase XL (AMV) (宝酒造社製、2620A) を含む全液量60 μ l をサーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9600, アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、30°C で10分間、続いて42°Cで1 時間保温した後、酵素を失活させるために99°Cで5 分間加熱してcDNAを調製した。

(5) プライマーの合成

COX 2 のmRNAの塩基配列 [ジーンバンク (GenBank) Accession番号: AL033533] に従って、PCR 反応のためのオリゴヌクレオチドプライマーをデザインしDNA合成機 (アプライド・バイオシステムズ社製) により合成した。すなわち、オリゴヌクレオチドプライマーCX1 (配列表の配列番号: 1 に示す; 以下同様)、CX2 (配列番号: 2) をそれぞれ合成した。MIP1 α のmRNAの塩基配列 (ジーンバンクAccession 番号: M23452) に従って、オリゴヌクレオチドプライマーMP1 (配列番号: 3)、MP2 (配列番号: 4) をそれぞれ合成した。また、ヒトランテスのmRNAの塩基配列 (ジーンバンクAccession 番号: NM 002985) に従

って、オリゴヌクレオチドプライマーRS1（配列番号：5）、RS2（配列番号：6）をそれぞれ合成した。さらに内部標準としてヒト β -アクトチンのmRNAの塩基配列（ジーンバンクAccession番号：M10277）に従って、オリゴヌクレオチドプライマーAC1（配列番号：7）、AC2（配列番号：8）を合成した。

（6）cDNAを鋳型にしたPCR法によるDNA断片の増幅

各5pmolの合成オリゴヌクレオチドプライマーCX1、CX2あるいはMP1、MP2あるいはRS1、RS2と内部標準としてヒト β -アクトチンのオリゴヌクレオチドプライマーAC1、AC2と前記調製したcDNA溶液2.5 μ lと10×Ex Taqバッファー（宝酒造社製）2.5 μ l、0.625U TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、RR001A）、0.2mM dNTP混合液を含む全液量25 μ lの反応系でサーマルサイクラーを用い、94°C 2分間を1サイクル、95°C 30秒、59°C 30秒、73°C 30秒のサイクルを30サイクル、72°C 5分間を1サイクルのプログラムで反応を行った。反応後のサンプルは分析するまで-20°Cで凍結して保存した。

各PCR反応液10 μ lを2.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果、LPS単独添加区分においてCOX2、MIP1 α 、ランテスの各mRNA由来のバンドの増幅が確認できた。すなわち、これら遺伝子はLPSにより誘導されることが確かめられた。これに対してDGEとLPSを添加した区分においては、COX2、MIP1 α 、ランテスのいずれのmRNA由来のバンドも増幅は確認できなかった。すなわち、DGEによりLPSによるこれら遺伝子の誘導は抑制されることが明らかとなった。また、TPA単独添加区分においてCOX2、MIP1 α の各mRNA由来のバンドの増幅が確認できた。すなわち、これら遺伝子はTPAにより誘導されることが確かめられた。これに対してDGEとTPAを添加した区分においては、COX2、MIP1 α のいずれのmRNA由来のバンドも増幅は確認できなかった。すなわち、DGEによりTPAによるこれら遺伝子の誘導は抑制されることが明らかとなった。この結果を第3図～第5図に示す。すなわち、第3図はCOX2、第4図はMIP1 α 、および第5図はランテ

スの各mRNA由来cDNAをPCRで増幅した反応液をアガロースゲル電気泳動で分析した結果である。また、第3図～第5図の各レーンについては、レーン1は100bp DNAラダーマーカー、レーン2は対照(水)、レーン3はDGE添加区分、レーン4はLPS添加区分、レーン5はDGEおよびLPS添加区分、レーン6はTPA添加区分、レーン7はDGEおよびTPA添加区分を示す。

実施例 5

(1) 単球の分離

実施例4-(1)と同様にしてPBMCを分離した。5%ヒトAB型血清、0.1mM 非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン(以上バイオウイタカー社製)、10mM HEPES(ナカライテスク社製)、1%ストレプトマイシン-ペニシリン(ギブコBRL社製)を含むRPMI1640培地(以下、5HRPMI培地と略す)に 2×10^6 cells/mlとなるようにPBMCを懸濁後、24穴細胞培養プレート(ファルコン社製)に1ml/ウェルずつまき、37°C、5%CO₂で湿式インキュベーター内にて1.5時間インキュベートした。1.5時間後に非接着性の細胞を吸引除去し、各ウェルをRPMI1640培地を用いて洗浄し、1mlの5HRPMI培地を加えて単球を得た。

(2) TNF α ELISA

上記で得られた単球に対して、各ウェルに10 μ lの1mM、2mM、または4mM DGE水溶液(それぞれ終濃度10 μ M、20 μ M、40 μ M)あるいは5mM、10mM、または20mMアガロビオース水溶液(それぞれ終濃度50 μ M、100 μ M、200 μ M)あるいは対照として10 μ lの水(すなわち、DGEの濃度およびアガロビオースの濃度は0 μ M)を添加し、37°C、5%CO₂で湿式インキュベーター内にて5時間インキュベートした。各ウェルに5 μ lの200ng/ml LPS水溶液を添加してさらに4時間培養後、培養上清を回収した。培養上清中のTNF α

の含量はエンザイムイムノサンドイッチアッセイ (ELISA ; Human TNF α ELISA Kit、エンドジェン社製、EH2-TNFA) で測定した。なお、細胞に対し、水のみ、DGE水溶液のみ (終濃度 40 μ M)、またはアガロビオース水溶液のみ (終濃度 200 μ M) を添加した区分を陰性対照とし、また、細胞に対し、水およびLPS水溶液を添加した区分を陽性対照とした。また、測定は全て2連で行った。その結果、DGE あるいはアガロビオース添加区分においてDGE あるいはアガロビオースの濃度依存的に、LPS 刺激TNF α 産生の抑制が認められた。それらの結果を第6図、第7図に示す。すなわち、第6図はDGE 添加あり又はなしの各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のTNF α の濃度を示す図であり、第7図はアガロビオース添加あり又はなしの各培養条件で細胞を培養したときの培養上清中のTNF α の濃度を示す図である。第6図、第7図において、横軸は培養条件を、縦軸はTNF α 濃度 (pg/ml) を示す。

実施例 6

(1) プライマーの合成

以下の表に示す各遺伝子のmRNAの塩基配列に従って、PCR 反応のためのオリゴヌクレオチドプライマーをデザインし前記と同様にして合成した。表4、5に、本実施例において評価した各遺伝子、ジーンバンクAccession番号、オリゴヌクレオチドプライマー名、配列表における当該プライマーの配列番号を示した。内部標準として、ヒト β -アクトチンのmRNAの塩基配列 (ジーンバンク Accession番号: M10277) に従って、配列表の配列番号: 61に示すオリゴヌクレオチドプライマーAC3を合成した。

表 4

遺伝子名 (略号)	ジーンバンク Accession 番号	プライマー 名 (配列番号)
・ サイトカインおよびサイトカインレセプター		
interleukin-6 (IL-6)	M14584	IL6-F (配列番号 : 9) IL6-R (配列番号 : 10)
interleukin-1 α (IL-1 α)	X02851	IL1 α -F (配列番号 : 11) IL1 α -R (配列番号 : 12)
interleukin-1 β (IL-1 β)	K02770	IL1 β -F (配列番号 : 13) IL1 β -R (配列番号 : 14)
tumor necrosis factor α (TNF α)	M10988	TNF-F (配列番号 : 15) TNF-R (配列番号 : 16)
interleukin-7 receptor (IL-7r)	M29696	IL7r-F (配列番号 : 17) IL7r-R (配列番号 : 18)
・ C C ケモカイン		
macrophage inflammatory protein-1- β (MIP1 β)	J04130	MIP1 β -F (配列番号 : 19) MIP1 β -R (配列番号 : 20)
liver and activation- regulated chemokine (LARC)	D86955	LARC-F (配列番号 : 21) LARC-R (配列番号 : 22)
macrophage-derived chemokine (MDC)	U83171	MDC-F (配列番号 : 23) MDC-R (配列番号 : 24)
・ C X C ケモカイン		
macrophage inflammatory protein-2- β (MIP2 β)	M36821	MIP2 β -F (配列番号 : 25) MIP2 β -R (配列番号 : 26)
macrophage inflammatory protein-2- α (MIP2 α)	M36820	MIP2 α -F (配列番号 : 27) MIP2 α -R (配列番号 : 28)
growth regulated protein-1 (Gro1)	J03561	Gro1-F (配列番号 : 29) Gro1-R (配列番号 : 30)

表 5

遺伝子名 (略号)	ジーンバンク Accession 番号	プライマー 名 (配列番号)
・その他		
matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)	J05070	MMP9-F (配列番号: 3 1) MMP9-R (配列番号: 3 2)
migration inhibitory factor -related protein-8(MRP8)	X06234	MRP8-F (配列番号: 3 3) MRP8-R (配列番号: 3 4)
lysozyme (Lyz)	M21119	Lyz-F (配列番号: 3 5) Lyz-F (配列番号: 3 6)
GABA(A) receptor-associated protein(GABArp)	NM007278	GABArp-F (配列番号: 3 7) GABArp-R (配列番号: 3 8)
interferon-induced 17-kDa /15-kDa protein(IFNp15/p17)	M13755	IFNp15/p17-F (配列番号: 3 9) IFNp15/p17-R (配列番号: 4 0)
interferon-inducible protein p78(IFNp78)	M33882	IFNp78-F (配列番号: 4 1) IFNp78-R (配列番号: 4 2)
SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog-2 (SCO2)	AL021683	SCO2-F (配列番号: 4 3) SCO2-R (配列番号: 4 4)
transketolase (TK)	L12711	TK-F (配列番号: 4 5) TK-R (配列番号: 4 6)
adenosine A2a receptor (ADORA2A)	S46950	ADORA2A-F (配列番号: 4 7) ADORA2A-R (配列番号: 4 8)
CD37 antigen (CD37)	X14046	CD37-F (配列番号: 4 9) CD37-R (配列番号: 5 0)
properdin P factor, complement (PFC)	M83652	PFC-F (配列番号: 5 1) PFC-R (配列番号: 5 2)
regulator of G-protein signaling-2(RGS2)	L13463	RGS2-F (配列番号: 5 3) RGS2-R (配列番号: 5 4)
Nef-associated factor-1 (NAF1)	AJ011896	NAF1-F (配列番号: 5 5) NAF1-R (配列番号: 5 6)
myeloid leukemia cell differentiation protein-1 (MCL1)	L08246	MCL1-F (配列番号: 5 7) MCL1-R (配列番号: 5 8)
signal peptidase complex (18kDa)(SPC18)	AF061737	SPC18-F (配列番号: 5 9) SPC18-R (配列番号: 6 0)

(2) cDNAを鋳型にしたPCR法によるDNA断片の増幅

上記に示した各合成オリゴヌクレオチドプライマーと内部標準として実施例4-(5)により合成したヒト β -アクチンのオリゴヌクレオチドプライマーAC1、AC2あるいは上記のAC3、および実施例4-(4)と同様の方法で合成したcDNA溶液を用いて、実施例4-(6)と同様の方法でPCR反応を行った。PCRのサイクル数は下記表に示すように30サイクルあるいは35サイクルで行った。反応後のサンプルは分析するまで-20℃で凍結して保存した。

各PCR反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動により分析した。その結果を表6、7に示す。ただし、表中において各遺伝子の発現量(各遺伝子のmRNA由来cDNAのPCRによる増幅の程度により評価)は少ない方から順に-, +/-, +, ++, +++の5段階で示した。また、表中のCon.は対照(水添加区分)、DGEはDGE添加区分、LPSはLPS添加区分、L+DはDGEおよびLPS添加区分、TPAはTPA添加区分、T+DはDGEおよびTPA添加区分を示す。

表 6

遺伝子	Con.	DGE	LPS	L+D	TPA	T+D	サイクル数
・ サイトカインおよびサイトカインレセプター							
IL-6	-	-	+++	-	+	-	3 0
IL-1 α	+/-	-	+++	+/-	+	-	3 0
IL-1 β	+	+	+++	+	++	+	3 0
TNF α	+/-	-	++	+/-	+	+/-	3 0
IL-7r	+/-	-	++	-	-	-	3 0
・ C C ケモカイン							
MIP1 β	+	+/-	+++	+/-	++	+/-	3 0
LARC	+/-	+/-	+++	+	++	+	3 0
MDC	-	-	+	-	-	-	3 0
・ C X C ケモカイン							
MIP2 β	+	+	++	+	++	+	3 0
MIP2 α	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	3 5
Gro1	+	+	+++	+	++	+	3 0

表 7

遺伝子	Con.	DGE	LPS	L+D	TPA	T+D	サイクル数
・その他							
MMP-9	-	-	-	-	+	-	3 0
MRP8	+	+	+/-	+	+/-	+	3 0
Lyz	+	+	+/-	+	+/-	+	3 0
GABArp	+	+	+/-	+	+	+	3 0
IFNp15/p17	+	+	+++	+/-	+	+/-	3 0
IFNp78	+	+/-	++	-	+	+/-	3 0
SC02	+	+	-	+	+	+	3 0
TK	+/-	+/-	+/-	+	-	+	3 0
ADORA2A	+	+/-	+++	-	+	-	3 5
CD37	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	3 5
PFC	+	+	-	+	+	+	3 5
RGS2	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	3 5
NAF1	+	-	++	+/-	+/-	-	3 0
MCL1	+	+	+/-	+	+	+	3 0
SPC18	+	+	+/-	+	+	+	3 0

以上の結果、DGEは、LPS またはTPA によるストレス性刺激を細胞に対し負荷した場合、かかる刺激により発現量が増大する遺伝子については発現量を減少させ、発現量が減少する遺伝子については発現量を増大させるように作用することが分かる。すなわち、DGEは、生体の恒常性を回復させる方向に働くことが

認められた。

配列表フリーテキスト

配列番号：1および2は、ヒトCOX 2のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：3および4は、ヒトMIP 1 α のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：5および6は、ヒトランテスのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：7および8は、ヒト β -アクチンのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：9および10は、ヒトIL-6のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：11および12は、ヒトIL-1 α のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：13および14は、ヒトIL-1 β のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：15および16は、ヒトTNF α のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：17および18は、ヒトIL-7 rのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：19および20は、ヒトMIP 1 β のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：21および22は、ヒトLARCのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：23および24は、ヒトMDCのmRNAの塩基配列に基づいてデ

ザインしたプライマーの配列である。

配列番号：25および26は、ヒトMIP2 β のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：27および28は、ヒトMIP2 α のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：29および30は、ヒトGro1のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：31および32は、ヒトMMP-9のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：33および34は、ヒトMRP8のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：35および36は、ヒトLyzのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：37および38は、ヒトGABArpのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：39および40は、ヒトIFNp15/p17のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：41および42は、ヒトIFNp78のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：43および44は、ヒトSCO2のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：45および46は、ヒトTKのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：47および48は、ヒトADORA2AのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：49および50は、ヒトCD37のmRNAの塩基配列に基づいて

デザインしたプライマーの配列である。

配列番号：51および52は、ヒトPFCのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：53および54は、ヒトRGS2のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：55および56は、ヒトNAF1のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：57および58は、ヒトMCL1のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：59および60は、ヒトSPC18のmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

配列番号：61は、ヒト β -アクチンのmRNAの塩基配列に基づいてデザインしたプライマーの配列である。

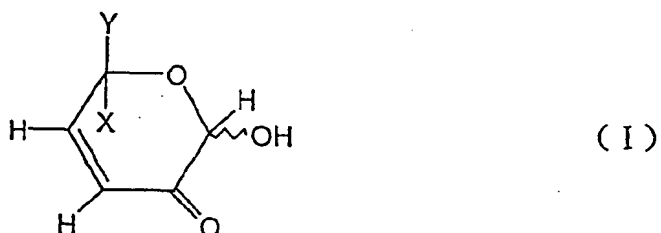
産業上の利用可能性

以上記載したごとく、本発明によれば、生体の恒常性の維持に必要な、たとえば、インターロイキン類産生調節、生体内酵素の産生調節に有用である遺伝子発現調節不調補正剤が提供され、また、かかる補正剤を含む、各種生体内因子の遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患の治療剤又は予防剤が提供され、当該因子の産生異常により惹起される疾患の治療又は予防を行うことができる。

また、本発明により各種生体内因子の遺伝子発現調節不調の補正方法が提供される。該方法は前記補正剤等を投与することからなり、それによって所望の因子の産生誘導または産生抑制を行い、生体内の恒常性を回復させ得る。かかる方法においては、前記補正剤等は各種因子の産生誘導剤または産生抑制剤として好適に使用される。さらに、本発明の一態様として、サイトカイン類や生体内酵素が関与する疾患の治療剤又は予防剤のスクリーニング方法も提供される。

請求の範囲

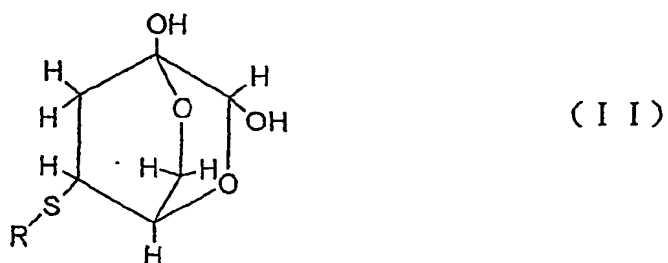
1. 式 (I) :



(式中、XおよびYは、HまたはCH₂ OH、ただし、XがCH₂ OHのとき、YはH、XがHのとき、YはCH₂ OHである。)

で表される化合物、

式 (II) :



(式中、RはSH基含有化合物から1つのSH基を除いた残基である。)

で表される化合物、

及びそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子発現調節不調補正剤。

2. インターロイキン-6 (interleukin-6 (ジーンバンクAccession 番号: M14584)) 遺伝子、

インターロイキン-10 (interleukin-10 (ジーンバンクAccession 番号: M576

27)) 遺伝子、

ヘムオキシゲナーゼ-1 [hemeoxygenase-1 (ジーンバンクAccession 番号: NM 002133)] 遺伝子、

プロスタグランジン G/H 合成酵素-2 [prostaglandin G/H synthase-2 (ジーンバンクAccession 番号: AL033533)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-1- α [macrophage inflammatory protein -1- α (ジーンバンクAccession 番号: M23452)] 遺伝子、

ランテス [RANTES (ジーンバンクAccession 番号: NM 002985)] 遺伝子、

インターロイキン-1 α [interleukin-1 α (ジーンバンクAccession 番号: X0 2851)] 遺伝子、

インターロイキン-1 β [interleukin-1 β (ジーンバンクAccession 番号: K0 2770)] 遺伝子、

腫瘍壊死因子 α [tumor necrosis factor α (ジーンバンクAccession 番号: M1 0988)] 遺伝子、

インターロイキン-7 レセプター [interleukin-7 receptor (ジーンバンクAccession 番号: M29696)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-1- β [macrophage inflammatory protein-1- β (ジーンバンクAccession 番号: J04130)] 遺伝子、

リバー アンド アクチベーション-レギュレイテッド ケモカイン [liver and activation-regulated chemokine (ジーンバンクAccession 番号: D86955)] 遺伝子、

マクロファージ-デライブド ケモカイン [macrophage-derived chemokine (ジーンバンクAccession 番号: U83171)] 遺伝子、

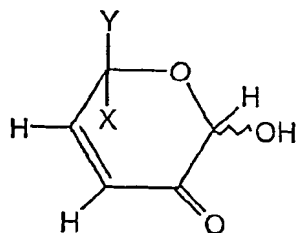
マクロファージ インフラマトリー プロテイン-2- β [macrophage inflammatory protein-2- β (ジーンバンクAccession 番号: M36821)] 遺伝子、

マクロファージ インフラマトリー プロテイン-2- α [macrophage inflamm

atory protein-2- α (ジーンバンクAccession 番号:M36820) } 遺伝子、
グロース レギュレイテッド プロテイン-1 [growth regulated protein-1 (ジーンバンクAccession 番号:J03561) } 遺伝子、
マトリックス メタロプロテイナーゼ-9 [matrix metalloproteinase-9 (ジーンバンクAccession 番号:J05070) } 遺伝子、
ミグレイション インヒビトリ-ファクター-リレイテッド プロテイン-8 [migration inhibitory factor-related protein-8 (ジーンバンクAccession 番号:X06234) } 遺伝子、
リゾザイム [lysozyme (ジーンバンクAccession 番号:M21119) } 遺伝子、
ギャバ(A) レセプター-アソシエイテッド プロテイン [GABA(A) receptor-associated protein (ジーンバンクAccession 番号:NM 007278) } 遺伝子、
インターフェロン-インデュースド 17-kDa/15-kDa プロテイン [interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein (ジーンバンクAccession 番号:M13755) } 遺伝子、
インターフェロン-インデュシブル プロテイン p78 [interferon-inducible protein p78 (ジーンバンクAccession 番号:M33882) } 遺伝子、
エスシーオー ホモログ-2 [SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog-2 (ジーンバンクAccession 番号:AL021683) } 遺伝子、
トランスケトラーゼ [transketolase (ジーンバンクAccession 番号:L12711) } 遺伝子、
アデノシン A2a レセプター [adenosine A2a receptor (ジーンバンクAccession 番号:S46950) } 遺伝子、
CD37 アンチゲン [CD37 antigen (ジーンバンクAccession 番号:X14046) } 遺伝子、
プロパージン P ファクター [properdin P factor, complement (ジーンバンクAccession 番号:M83652) } 遺伝子、

レギュレーター オブ G-プロテイン シグナリング-2 (regulator of G-protein signaling-2 (ジーンバンクAccession 番号 : L13463)) 遺伝子、
 Nef-アソシエイテッド ファクター-1 (Nef-associated factor-1 (ジーンバンクAccession 番号 : AJ011896)) 遺伝子、
 ミエロイド ロイケミア セル ディファレンシエイション プロテイン-1 (myeloid leukemia cell differentiation protein-1 (ジーンバンクAccession 番号 : L08246)) 遺伝子、及び
 シグナル ペプチダーゼ コンプレックス (signal peptidase complex (18kDa) (ジーンバンクAccession 番号 : AF061737)) 遺伝子、
 からなる群から選択される 1 以上の遺伝子の発現調節不調を補正する、請求項 1
 記載の遺伝子発現調節不調補正剤。

3. 式 (I) :

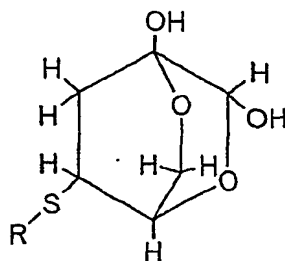


(I)

(式中、XおよびYは、HまたはCH₂OH、ただし、XがCH₂OHのとき、YはH、XがHのとき、YはCH₂OHである。)

で表される化合物、

式 (I I) :



(式中、RはSH基含有化合物から1つのSH基を除いた残基である。)

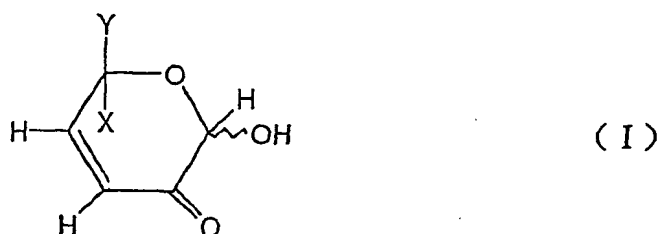
で表される化合物、

及びそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物を有効成分として含有してなる、請求項2において記載の遺伝子群から選択される1以上の遺伝子の発現調節不調の補正を要する疾患の治療剤または予防剤。

4. 疾患が炎症性疾患である請求項3記載の治療剤または予防剤。

5. インターロイキン-6産生抑制剤、インターロイキン-10産生抑制剤、ヘムオキシゲナーゼ産生誘導剤、プロスタグランジンG/H合成酵素-2産生抑制剤、マクロファージインフラマトリープロテイン-1- α 産生抑制剤、ランテス産生抑制剤または腫瘍壊死因子 α 産生抑制剤である請求項3または4記載の治療剤または予防剤。

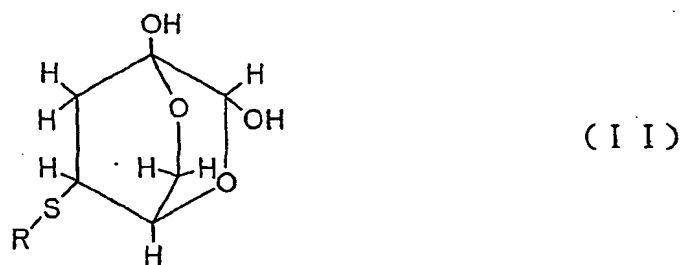
6. 式 (I) :



(式中、XおよびYは、HまたはCH₂ OH、ただし、XがCH₂ OHのとき、YはH、XがHのとき、YはCH₂ OHである。)

で表される化合物、

式 (II) :

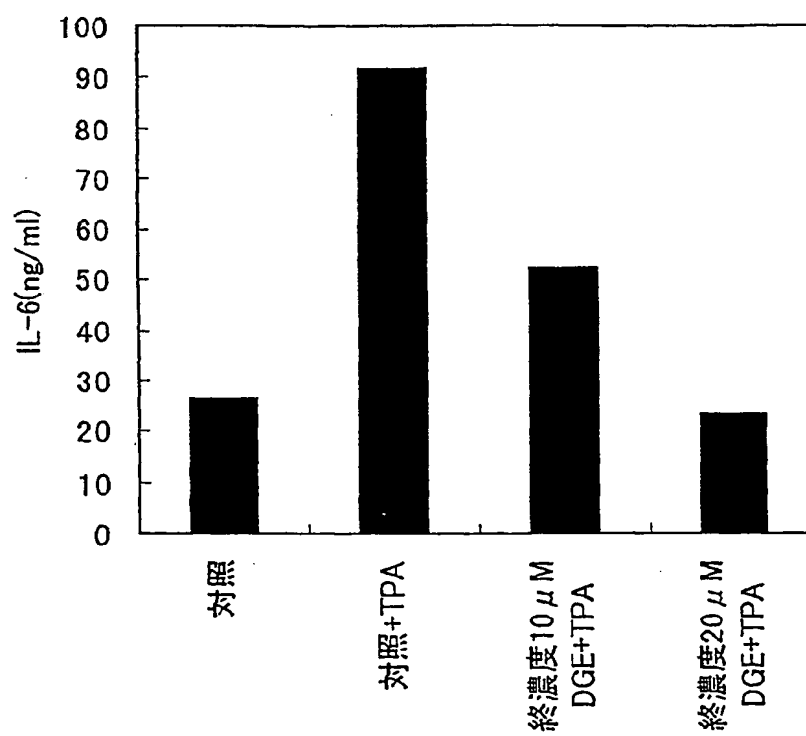


(式中、RはSH基含有化合物から1つのSH基を除いた残基である。)

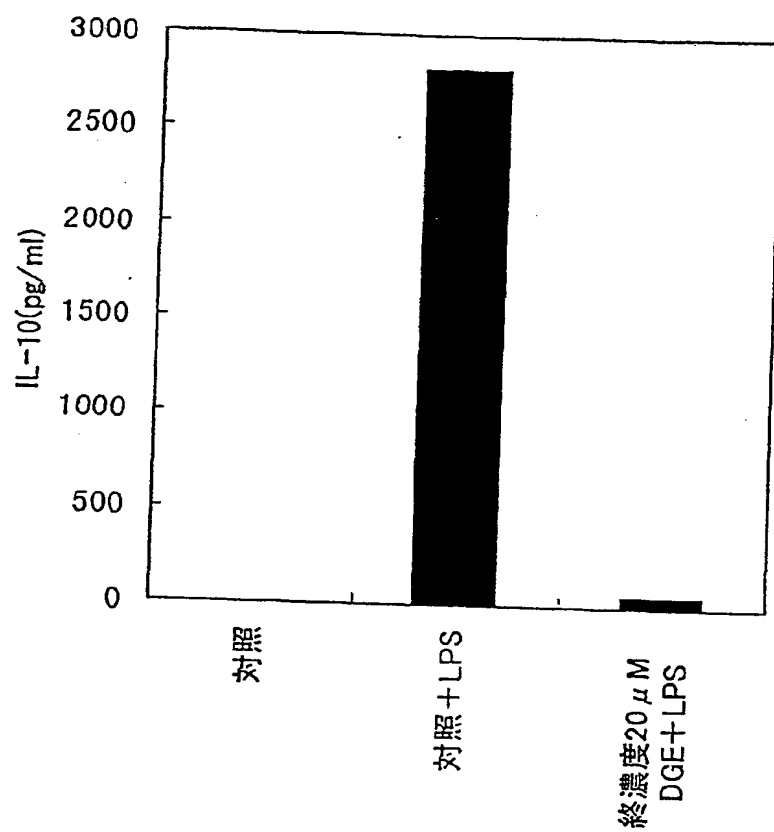
で表される化合物、

及びそれらの塩から選択される少なくとも1種の化合物を哺乳動物に投与することとを特徴とする遺伝子発現調節不調の補正方法。

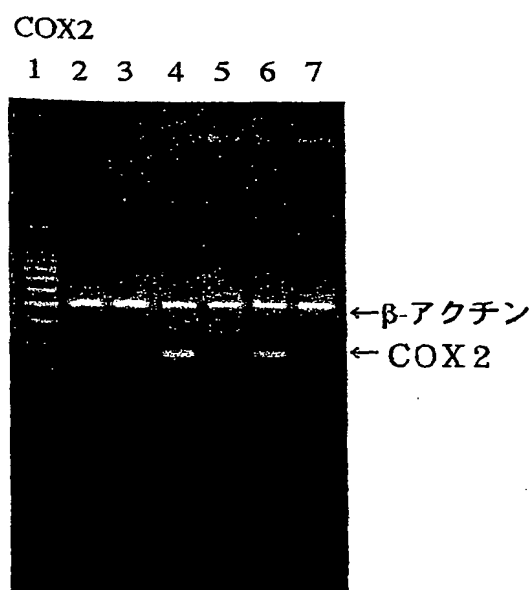
7. 請求項2において記載の遺伝子群から選択される1以上の遺伝子の発現調節不調を補正する、請求項6記載の遺伝子発現調節不調の補正方法。



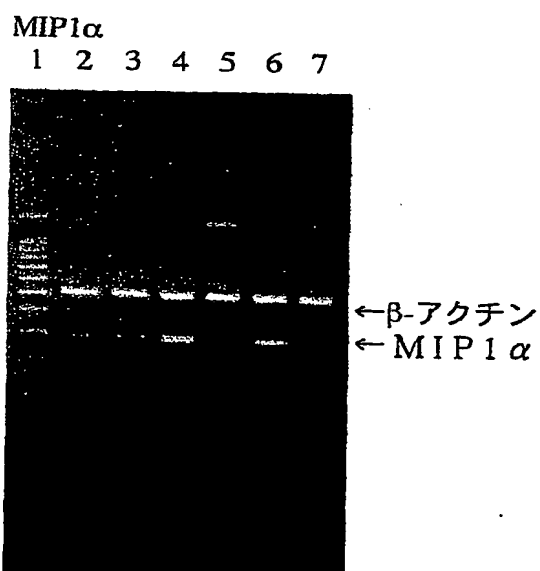
第 1 図



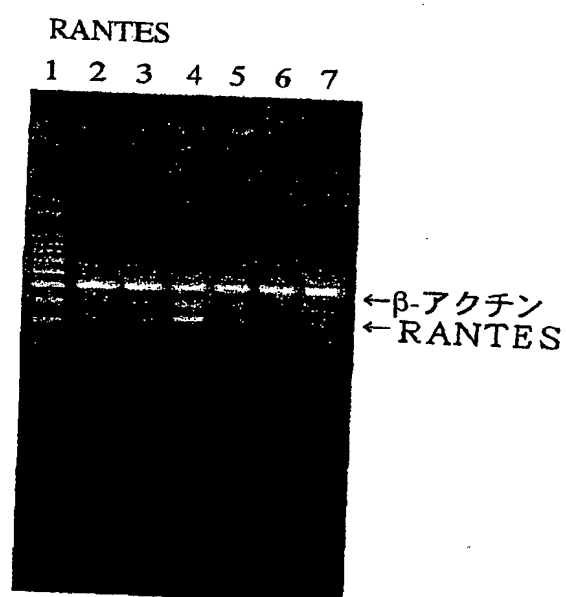
第 2 図



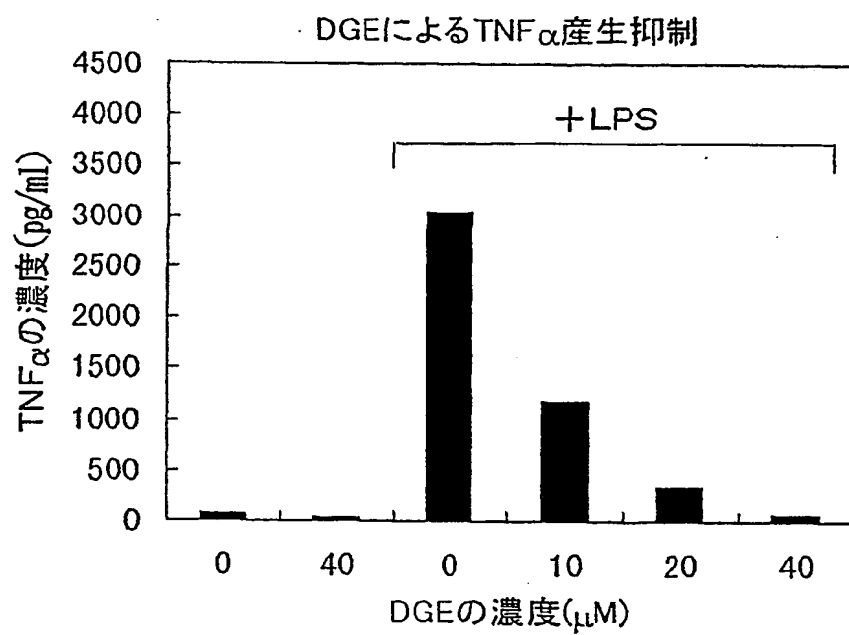
第 3 図



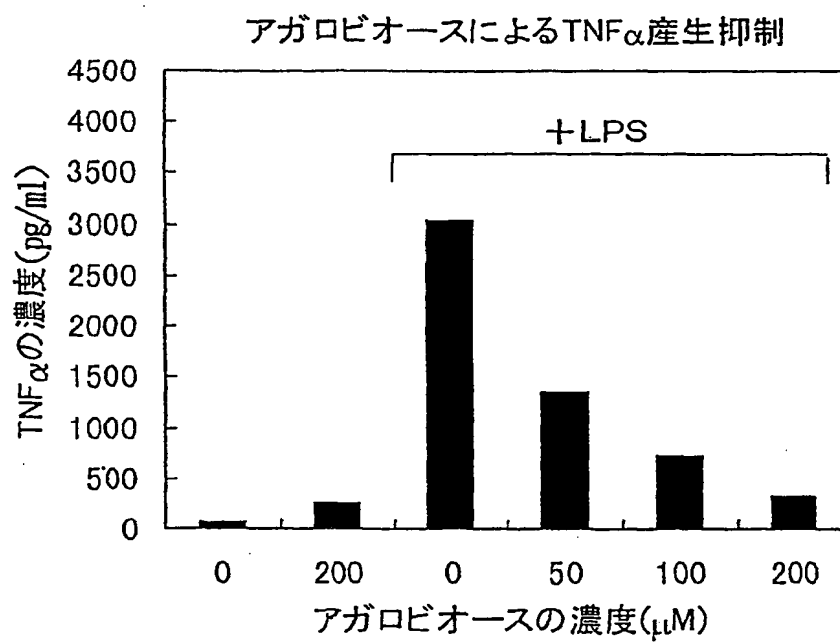
第 4 図



第 5 図



第 6 図



第 7 図

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Therapeutic agents

<130> 01-011-PCT

<150> JP 2000-4989

<151> 2000-01-13

<150> JP 2000-303711

<151> 2000-10-03

<160> 61

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human prostaglandin G/H synthase-2 mRNA.

<400> 1

acggtgaaac tctggct

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human prostaglandin G/H synthase-2 mRNA.

<400> 2

ggatgctcct gtttaag

17

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-1- α mRNA.

<400> 3

acattccgctc acctgctcag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-1- α mRNA.

<400> 4

ggtcgctgac atatttctgg

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human RANTES mRNA.

<400> 5

ctccacaggt accatgaagg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human RANTES mRNA.

<400> 6

gtaagttcag gttcaaggac

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human β -actin mRNA.
A.

<400> 7

tggccgtacc actggcatcg

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human β -actin mRNA.
A.

<400> 8

tccttctgca tcctgtcggc aa

22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-6 mRNA.

<400> 9

ccactcacct cttcagaacg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-6 mRNA.

<400> 10

gatgagttgt catgtcctgc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-1 α mRNA.

<400> 11

gctgcatgga tcaatctgtg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-1 α mRNA.

<400> 12

tcttcattctt gggcagtcac

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-
1 β mRNA.

<400> 13

tggcagaagt acctaagctc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-
1 β mRNA.

<400> 14

catatggacc agacatcacc

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human tumor necrosis factor α mRNA.

<400> 15

aaaggacacc atgagcactg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human tumor necrosis factor α mRNA.

<400> 16

cgagaagatg atctgactgc

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-7 receptor mRNA.

<400> 17

tggagaaagt ggctatgctc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interleukin-7 receptor mRNA.

<400> 18

ggcggtaagc tacatcatgc

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-1- β mRNA.

<400> 19

gaagcttctg agttctgcag

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-1- β mRNA.

<400> 20

ttcctgtctc tgagcagctc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human liver and activation-regulated chemokine mRNA.

<400> 21

aagagtttgc tcctggctgc

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human liver and activation-regulated chemokine mRNA.

<400> 22

ttggatttgc gcacacagac

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage-d

erived chemokine mRNA.

<400> 23

acagactgca ctcctggttg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage-d
erived chemokine mRNA.

<400> 24

aggctcttca ttggctcagc

20

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage i
nflammatory protein-2- β mRNA.

<400> 25

cgtaggtcact gaactgcgc

19

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-2- β mRNA.

<400> 26

acttctctcc tgcagttgg

20

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-2- α mRNA.

<400> 27

tgctgctcct gtcctgg

18

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human macrophage inflammatory protein-2- α mRNA.

<400> 28

ctgcccattc ttgagtgtgg

20

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human growth regulated protein-1 mRNA.

<400> 29

aacatccaaa gtgtgaacgt g

21

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human growth regulated protein-1 mRNA.

<400> 30

ctctgcagct gtgtctctc

19

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human matrix metalloproteinase-9 mRNA.

<400> 31

cttctccaga agcaactgtc

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human matrix metalloproteinase-9 mRNA.

<400> 32

accacaactc gtcacgtcg

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human migration inhibitory factor-related protein-8 mRNA.

<400> 33

tcacgacgt ctaccacaag

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human migration inhibitory factor-related protein-8 mRNA.

<400> 34

accagaatga ggaactcctg

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human lysozyme mRNA.

<400> 35

tgtcctcctt tctgttacgg

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human lysozyme mRNA

A.

<400> 36

tgacaggcat taactgctcc

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human GABA(A) receptor-associated protein mRNA.

<400> 37

aagaagagca tccgttcgag

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human GABA(A) receptor-associated protein mRNA.

<400> 38

tggtgttcct ggtacagctg

20

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interferon- γ induced 17-kDa/15-kDa protein mRNA.

<400> 39

catgtcgggtg tcagagctg

19

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interferon- γ induced 17-kDa/15-kDa protein mRNA.

<400> 40

ctcacttgct gcttcaggtg

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interferon- γ inducible protein p78 mRNA.

<400> 41

gtggctgaga acaacctgtg

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human interferon- γ inducible protein p78 mRNA.

<400> 42

agtcagatcc gggacatctc

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog-2 mRNA.

<400> 43

gcagcagcaa aagcgaacag

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human SCO(cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog-2 mRNA.

<400> 44

gatgaagaca ggctgcactg

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human transketolas
e mRNA.

<400> 45

cctacgtatc agtccatcc

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human transketolas
e mRNA.

<400> 46

catacagagc cctctgacag

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human adenosine A2

a receptor mRNA.

<400> 47

tgtggctcaa cagcaacctg

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human adenosine A2
a receptor mRNA.

<400> 48

gaccacatcc tcaaagagac

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human CD37 antigen
mRNA.

<400> 49

gcctcatcaa gtacttcctc

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human CD37 antigen mRNA.

<400> 50

atgaggactt ggaaccagtc

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human properdin P factor, complement mRNA.

<400> 51

ctaccagaaa cgtagtggtg

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human properdin P factor, complement mRNA.

<400> 52

gtgtctcctt aggttcgtgg

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human regulator of G-protein signaling-2 mRNA.

<400> 53

ttggctgttc aacacgactg

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human regulator of G-protein signaling-2 mRNA.

<400> 54

ggcagttgta aagcagccac

20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human Nef-associated factor-1 mRNA.

<400> 55

agcagaattc accagagagc

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human Nef-associated factor-1 mRNA.

<400> 56

ttccatcttc ggtgagcctg

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human myeloid leukemia cell differentiation protein-1 mRNA.

<400> 57

gcatgcttcg gaaactggac

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human myeloid leukemia cell differentiation protein-1 mRNA.

<400> 58

gaagttacag cttggagtcc

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human signal peptidase complex (18kDa) mRNA.

<400> 59

gattgtagtg gtgctcagtg

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human signal pepti

dase complex (18kDa) mRNA.

<400> 60

tgccatcttc ccaggaacag

20

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed primer based on nucleotide sequence of human β -actin mRNA.
A.

<400> 61

caagagatgg ccacggctgc t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07D309/32, C07D493/08, A61K31/351, A61K31/357, A61P43/00, 111, A61P1/16, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07D309/32, C07D493/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	WO, 99/64424, A1 (Takara Shuzo Co.), 16 December, 1999 (16.12.99), entire description & EP, 1086952, A1	1-5
Y	JP, 6-80565, A (ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.), 22 March, 1994 (22.03.94), compound No.10 (Family: none)	1-5
PA	WO, 00/43018, A1 (Takara Shuzo Co.), 27 July, 2000 (27.07.00), entire description & AU, 2005300, A	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 April, 2001 (13.04.01)

Date of mailing of the international search report

24 April, 2001 (24.04.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00082

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 and 7 pertain to "methods for treatment of the human body by therapy"
(Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The compounds relating to the formulae (I) and (II) have neither a skeleton nor a substituent in common. Therefore, it is considered that the same pharmacological effect, if any, exhibited by these compounds is not brought about by the chemical structures.

Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between the groups of the above-described compounds involving special technical features, so far as disclosed in the description.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07D309/32, C07D493/08, A61K31/351, A61K31/357, A61P43/00, 111, A61P1/16, A61P29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07D309/32, C07D493/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	WO, 99/64424, A1 (Takara Shuzo Co.) 16. 12月. 1999 (16. 12. 99) 文献全体 &EP, 1086952, A1	1-5
Y	JP, 6-80565, A (石原産業株式会社) 22. 3月. 1994 (22. 03. 94) 化合物 No. 10 を参照 ファミリーなし	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 04. 01

国際調査報告の発送日

24.04.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高岡 裕美

印

4 P

9737

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO, 00/43018, A1 (Takara Shuzo Co.) 27. 7月. 2000 (27. 07. 00) 文献全体 &AU, 2005300, A	1-5

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6-7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求項6-7に記載されているものは、「治療による人体の処置方法」に該当する。
(特許協力条約に基づく規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

式(I), (II)に係る化合物には、共通する特定の骨格あるいは置換基が何ら存在しないことから、これらが同一の薬理作用を示したとしてもそれは化学構造によるものではないと思われる。

したがって、本明細書の開示の範囲内では、上記化合物群に特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.